

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580475

研究課題名(和文)蛋白質の高可溶化・高機能化・治療薬開発をめざす「可溶化誘導好塩性タグ」の創製法

研究課題名(英文) Solubilization-inducing tag for solubilization, development of higher function and medicine for proteins.

研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA, MASAO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20112782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：好塩性酵素は、総荷電が大きくマイナスに偏った酸性蛋白質であり、広いpH領域で多量のマイナス荷電をもち、通常酵素が機能しない高濃度塩存在下でも「塩析効果」を受けず機能できる。高次構造を壊す他のストレス環境下でも多量のマイナス荷電による高可溶性と荷電の反発による「非凝集性」を保持し、可逆的な構造回復能を示す「不可逆的に変性しない酵素」である。この好塩性タンパク質遺伝子を分離、大量発現させ、性質検討を行った。また、融合タンパク質作成のタグとしてその全長または部分配列を利用した。

研究成果の概要(英文)：Halophilic proteins, acidic proteins with high content of negative charge, can function under high salt conditions without salting-out effects of salts. High solubility and negative charge repulsion make halophilic protein resistant to various stresses which induce denaturation of protein, and thus, halophilic proteins are highly resistant to denaturation (resistant to irreversible-aggregation). We isolated several genes of halophilic proteins, characterized, and developed tag to construct fusion proteins.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：好塩性蛋白質 可溶化 高次構造形成 まき戻り 凝集耐性 タグ

## 1. 研究開始当初の背景

通常生物がとて生きてゆけない特殊な環境で生息できる「極限環境生物」は、厳しい環境で生き抜く「極限能力」を持っている。高い塩分濃度を好む好塩菌は、味噌・醤油の醸造・塩蔵食品加工など食品産業において重要であり、塩湖など自然界にも広く分布し、人の生活に比較的「身近な極限環境微生物」である。中度好塩菌(主に真正細菌)は、0.2M~飽和塩濃度という極めて広範囲の塩濃度に適応して生育する。この菌の分泌型酵素は、外界の塩濃度に対応して、低濃度~高濃度の幅広い塩存在下で良く働き、安定性に塩を要求しないものが多く産業利用には最適である。好塩性酵素は、酸性アミノ酸に富み、総荷電がマイナス荷電に偏っている(等電点が低い酸性タンパク質)ので、この性質が高い可溶性と、変性しても凝集しないで巻き戻る高い構造可逆性を保証している。

現在、多種生物のゲノムが解読され、この情報を生かすうえで最大のネック(難関)は、ゲノム情報から活性ある蛋白質を安価・大量に得て利用する発現方法の開発であり、微生物における「有用異種蛋白質」の「可溶性発現」は最大の課題である。さらに、先進国では高齢化時代を迎え、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病などが社会問題となっているが、これらの疾病においては、難溶性のタンパク質凝集体(アミロイドオリゴマー・アミロイド線維)の蓄積が認められ、これが治療への重要なターゲットとなっているが、現在はアミロイドを *in vivo* で溶解させる有効な手段が開発されていない現状であり、難溶性蛋白の可溶化手段が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究では、高い可溶性と変性しても凝集しないで巻き戻る高い構造可逆性を持っている好塩性タンパク質の全体配列、もしくは一部領域を用いて、「蛋白質の高可溶化・高機能化・治療薬開発をめざす「可溶化誘導好塩性タグ」の創製」を目的とする。具体的には、(1)好塩性蛋白質を用いて「可溶化誘導好塩性融合タグ」の開発と(2)高可溶性の好塩性酵素とは「対極」に位置する「難溶性・難分解性アミロイド線維」を好塩性蛋白質から形成させ、その形成条件と形成メカニズムの特徴を明らかにし、さらにすでに形成された、もしくは形成途中のアミロイドを可溶化させる「アミロイド可溶化両親媒性様タグ」の開発を検討する。

## 3. 研究の方法

一般に中度好塩菌の分泌性蛋白質は、好塩菌が生育する高い塩濃度環境に適応していて強い好塩性を示す。すなわち強い総マイナ

ス荷電を持ち、高塩濃度下でも塩析されにくい高い可溶性と非凝集性を示す。さらに環境塩濃度の低下や頻繁な変動にも耐えるように、適度な強さの疎水性蛋白質コア構造を有している。2.5M以上の高濃度塩を常にその生育に要求する高度好塩菌由来の高度好塩性酵素は、疎水的なコア構造が極めて弱く、高濃度塩による塩析効果の助けを借りてコア構造ができ高次構造が形成されるので、低塩濃度では構造がゆるんで変性してしまう。この点が、同じく強い好塩性を示すものの高度好塩性酵素と中度好塩菌由来分泌酵素との大きな違いであり、後者の有用性が明白である。後者は高い塩濃度から低い塩濃度まで、安定で強い活性と高い可溶性・構造可逆性を発揮することができる産業利用を考えた場合には理想的な酵素である。そこで、精製にアフィニティカラムを使える特異的親和性(糖などへの結合能)を持った高可溶性好塩性蛋白質を発現パートナーとした高可溶性融合蛋白質発現系の開発を目的とする。また、その一部分を用いた汎用性可溶性タグを開発する。具体的には、好塩性糖結合ドメイン(Carbohydrate-binding module, CBM)などを用いた融合蛋白質発現ベクターの開発を目的とする。

アミロイド線維は、典型的な難溶性・難分解性の蛋白質凝集体であり、高可溶性が最大の特徴である好塩性蛋白質とは全くの「対極」にあり、好塩性蛋白質によるアミロイド線維形成に関する研究は今までに全く行われていない。アミロイド線維の形成機構は精力的に研究され、原理的にはどのような蛋白質においてもアミロイド線維の形成は可能であると言われている。そこで、我々は数多くの好塩性蛋白質(構造リッチや膜蛋白等含む)の大量発現系を持っているので、好塩性蛋白質を大量精製し、*in vitro* でアミロイド線維形成条件を検討する。形成条件が明らかになれば、特に、そのアミノ酸配列に注目し、好塩性タンパク質の特徴である可溶性配列との共存の可能性を検討する。

## 4. 研究成果

(1)好塩性 アミラーゼのクローニングと澱粉結合部位の同定および「可溶化誘導好塩性融合タグ」の開発

澱粉を加水分解する酵素を総称して *amylase* と呼ぶが、 $\alpha$ -アミラーゼは、生物界での分布の広さ、澱粉分解における役割(生理的役割)の大きさ、生物当たりの生産量の大きさなどの点から最も主要なアミラーゼである。大部分の  $\alpha$ -アミラーゼは分子量が50,000前後であるが、微生物が生産するものにはより大きなものもあり、中度好塩菌 *Kocuria varians* 由来の好塩性アミラーゼも分子量69,000と大きく、精製後N-末端と内部のアミノ酸配列を決定し、その情報を元

に遺伝子をクローニングしたところ、N - 末端側に  $\alpha$ -アミラーゼの触媒ドメインがあり、そのあとに一次構造上CBM25ファミリーに属すると思われる澱粉結合ドメイン(starch binding domain, SBD)がタンデムに2個つながっていることが判明した(SBD1-SBD2)。この配列が澱粉に結合能があるかどうかを調べるために、大腸菌で His-ラクタマーゼ (BLA)-SBD1-SBD2, His-SBD1-SBD2, もしくは His-SBD1 を発現させた(図1)。

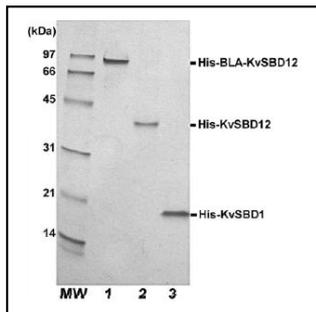


図1 . 大腸菌における SBD の発現

発現した蛋白質を Ni カラムで均一に精製し(図1)澱粉への吸着能を調べた。図2

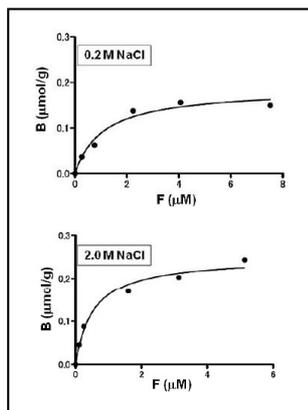


図2 . SBD1-SBD2 の澱粉結合曲線

に示すように、0.2M NaCl 存在下での  $K_d$  は  $1.11 \mu\text{M}$ , 2.0M NaCl 存在下では  $0.54 \mu\text{M}$  となり、塩濃度依存的な結合が観察された。

すでに3次元構造が解明されている

*Bacillus halodurans* の SBD (下段) を元にしてモデリングをし、表面電荷をマイナス(赤)、プラス(青)、中性(白)で表すと図3のようになり、SBD1(上段)、SBD2(中段)とも大きくマイナスに偏り、好塩性蛋白の特徴を示した。

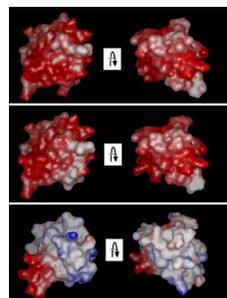


図3 . 表面電荷

そこで、大腸菌発現では、封入体を形成し100%不溶性となる一本鎖抗体(scFv)(A)とヒ

ト IL1 (B)を、この SBD1-SBD2 ドメインの後ろに結合させて、融合蛋白質を作成したところ図4に示すように、全体(1)のそれぞれ約70%, 90%が可溶性画分(2)に回収され、沈殿画分(3)には少なく、好塩性 SBD ドメインの高い可溶化力が示された。

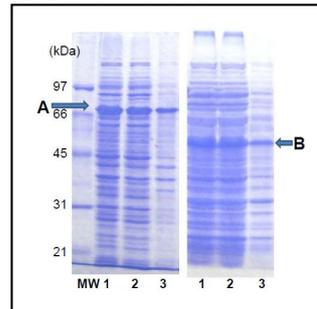


図4 . SBD1-SBD2 との融合蛋白質の発現と可溶性の検討

よって、当初の目的とした特異的吸着能をもち、affinity column で容易に精製でき、また、高い可溶性を持つ「可溶化誘導好塩性タグ」の開発に成功した。

(2) 高可溶性の好塩性蛋白質を用いた「難溶性・難分解性アミロイド線維」の形成条件と形成メカニズムの特徴の検討

アルツハイマー型認知症患者の脳にはアミロイドベータ蛋白質が蓄積する。アミロイドとは、蛋白質が部分変性し、会合凝集して形成される規則的な重合体であり、ストランドが線維軸と直行する方向に規則的配列したクロスシート構造をとっている。アミロイド線維沈着により起こる疾患には、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病なども知られているが、アミロイド線維構造は、病気と関係なく、蛋白質本来持っている基本構造の一つであると考えられている。高可溶性の好塩性酵素とは「対極」に位置する「難溶性・難分解性アミロイド線維」を好塩性蛋白質から形成させる条件と形成メカニズムの特徴を明らかにするために、まず、典型的な好塩性蛋白質である中度好塩菌ペリプラズムに局在する金属輸送蛋白質(metal transporter, MT)を大腸菌で大量発現させ、アミロイド線維形成条件を検討した。

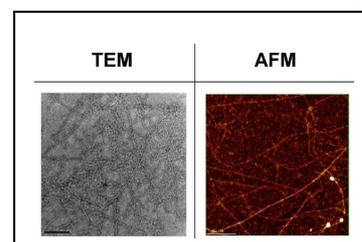


図5 . MT から酸性・高温条件下で形成されたアミロイド線維の透視型電子顕微鏡(TEM)と原子間力顕微鏡(AFM)の写真

図5に示すように、当初困難と予測された好

塩性蛋白質 MT からの線維形成に容易に成功した。MT 蛋白質を 3mg/ml 程度の蛋白濃度に調製し、pH2 (50 mM Gly-HCl buffer), 58 において保温処理したところ、数日後から電顕等の形態観察で線維形成が認められた。アミロイド線維に特異的に結合し 485nm に蛍光を発するチオフラビン T (図 6) による蛍光分析や、CD スペクトルによる構造測定 (図 6) においてもアミロイド線維形成が確認された。

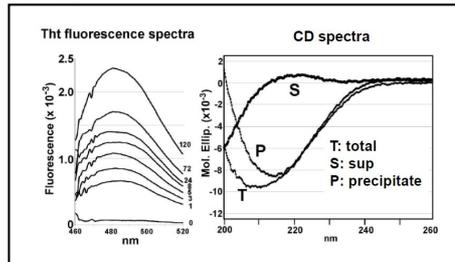


図 6 .MT より形成されたアミロイド線維の分光学的解析 (蛍光および CD 測定)

形成されたアミロイド線維を SDS-ゲル電気泳動で分析したところ、MT 蛋白質は、酸性高温状態で加水分解され、ペプチドに分解されていることが判明し、ペプチド分析の結果、比較的疎水的のアミノ酸を多く含む 3 種類のペプチド配列が同定された。この結果は、好塩性 MT 蛋白において隣り合っている親水性アミノ酸を多く含んだ領域をつなぎ合わせた材料を用いることによる高可溶性領域のアミロイド線維形成に対する効果の検証の可能性を示唆するものである。

また、アミロイド線維中に同定された 3 種類のペプチド配列におけるアミロイド線維形成コア領域をシミュレーションし、それぞれ 10, 17, 10 残基のアミノ酸からなるコア配列候補を予測できた。この配列をもつペプチドを化学合成し、アミロイド線維の形成を試みたところ見事にアミロイド線維が形成された (図 7)。この場合アミロイド線維は 37 度でも形成され、コア領域を用いることで、より温和な条件でもアミロイド線維が形成されることが判明した。

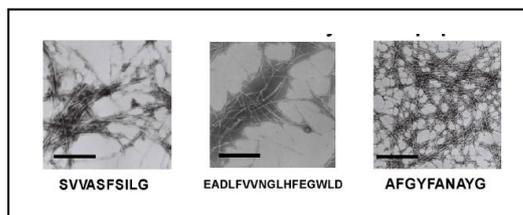


図 7 . コア配列をもつ化学合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成

さらに MT 蛋白質をもちいた上記条件とは異なり、分解されていない全長の MT 蛋白質からのアミロイド線維の形成条件を種々検討した結果、2,2,2-trifluoroethanol (TFE) を 10-20% 添加した 50mM Tris-HCl buffer, pH7.8 を用いることにより、高効率にアミロ

イド線維が形成されることが判明した。図 8 に電気泳動図(A)とチオフラビン蛍光の経時変化(B)、およびアミロイド線維を超遠心分離したサンプルの CD スペクトル分析(C)の結果を示した。

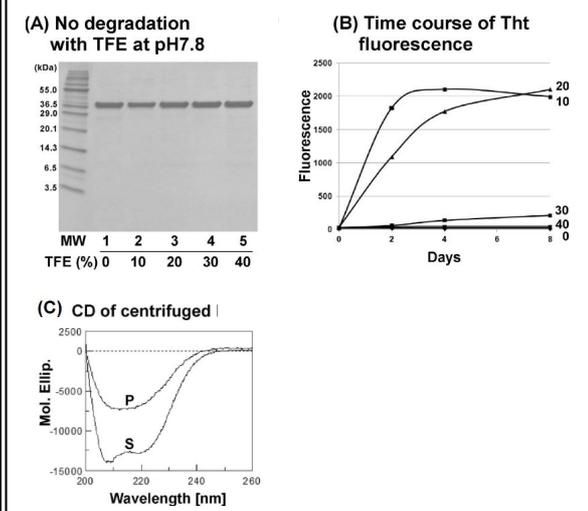


図 8 . TFE 添加条件におけるアミロイド線維形成

図 8 A より、この条件では MT 蛋白質は加水分解されず、全長のまま保持されていることが分かる。また、図 8 B より、TFE が 10-20% 含まれている条件で効率よくアミロイド線維が形成され、それよりも低い濃度でも高い濃度でも形成されないことが判明した。図 8 C は、形成されたアミロイド線維を超遠心し、アミロイド線維(P)と未だアミロイド線維を形成していない可溶性(S)MT 蛋白質を分離後、それぞれの画分の CD スペクトルを測定したもので、沈殿部分(P)に構造に富んだ蛋白質、すなわち、アミロイド線維が濃縮されていることが示されている。図 9 は、上記条件での電子顕微鏡による形態観察結果である。

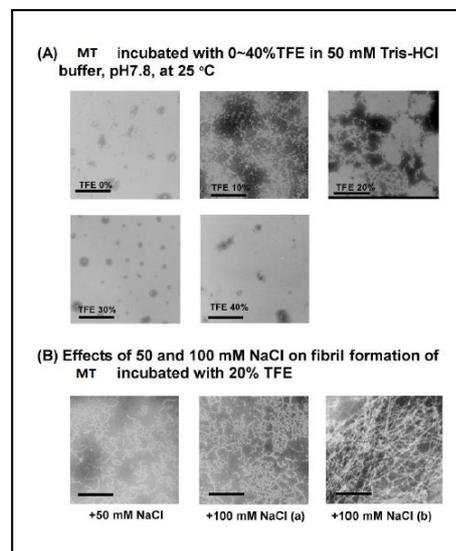


図 9 . TFE 添加条件における電顕観察

図9 Aに示したように、10-20%の TFE を添加したときのみ、アミロイド線維が認められる。アミロイド線維の形態は、酸性、高温条件下とは異なり、短い「糸くず」のような形態であった。また、図9 Bは、TFE 20%存在下、さらに NaCl を 50-100 mM 添加して、そのアミロイド形成に対する効果を見たものである。NaCl 添加で明らかにアミロイド線維形成が促進され、一部、長い典型的なアミロイド線維の形成も観察された( B の右図)。

TFE による MT 蛋白質の部分的変性と NaCl による塩析効果によるものと考えられる。

以上のように、当初の予想に反して、好塩性蛋白質からも比較的容易に不溶性のアミロイド線維が形成されることが明らかになった。この一連の観察の中で、好塩性蛋白質によるアミロイド線維形成の特徴が明らかになった。上記に示したいくつかの形態観察の図に明らかなように、アミロイド線維以外の不定形凝集物は全く観察されず、純粋なアミロイド線維が形成されていることである。家族性アミロイドーシスの原因となっている非好塩性通常蛋白質であるリゾチームのアミロイド線維形成を上記と同様の条件で観察すると、多量の不定形凝集体とアミロイド線維が共に形成されていることが観察された。これは、部分変性リゾチームが極めて凝集しやすい性質を持っていることとよく一致し、高い可溶性をもつ好塩性蛋白質においては、変性しても不定形の凝集体は作らず可溶性のまま保持されるか、または、不可逆的な凝集体としての規則的なアミロイド線維形成の2つの経路しかないことを示唆した明快な結果と解釈できる。

以上のように本基盤研究では、世界で初めて超可溶性の好塩性蛋白質からアミロイド線維の形成に成功し、その形成条件や特徴を明らかにすることができた。また、アミロイド線維を形成しやすい「コア配列」も明らかにすることができ、短い好塩性蛋白由来モデルペプチドでの検討も可能となった。今後は、このコア配列を中心に、可溶性タグを連結させることにより、コア配列によるアミロイド線維形成にどのような効果があるかを検証してゆきたい。現状では、最終目標の両親媒性タグの開発にまでは至っていないが、その道筋を明らかにすることができたと考えている。現在までに得られた知見を元にして、各種化学合成ペプチドを合成し、アミロイド線維形成のステップごとに、その効果を明らかにしてゆきたい。すなわち、高次構造の部分的変性、核の形成、有毒とされているアミロイドオリゴマーの形成、線維の伸長などの各過程である。アミロイド線維の可溶性、もしくは少なくとも核形成の阻害、線維の伸長抑制などの効果を検証してゆきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Secretory production of single-chain

antibody (scFv) in *Brevibacillus choshinensis* using novel fusion partner. Tokunaga M, Mizukami M, Yamasaki K, Tokunaga H, Onishi H, Hanagata H, Ishibashi M, Miyauchi A, Tsumoto K, Arakawa T. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(19):8569-8580. 査読有

2. Amyloid fibril formation in vitro from halophilic metal binding protein: Its high solubility and reversibility minimized formation of amorphous protein aggregations.

Tokunaga Y, Matsumoto M, Tokunaga M, Arakawa T, Sugimoto Y. *Protein Sci*. 2013;22(11):1582-1591. 査読有

3. Halophilic characterization of starch-binding domain from *Kocuria varians* -amylase. Yamaguchi R, Inoue Y, Tokunaga H, Ishibashi M, Arakawa T, Sumitani J, Kawaguchi T, Tokunaga M.

*Int J Biol Macromol*. 2012;50(1):95-102. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. *Brevibacillus* 発現系を用いた一本鎖抗体(scFv)の発現生産、徳永正雄、山崎晃路、水上 誠、大西廣優、徳永廣子、石橋松二郎、花方 寛、宮内 明、荒川 力、2012/12月13-15日、生化学会2012年度大会(福岡県福岡市)

2. 塩依存的に巻き戻る中度好塩菌 *Kocuria varians* 由来 -アミラーゼの性質検討とクローニング、山口類、石橋松二郎、徳永廣子、荒川 力、徳永正雄、2011/6月7-9日 第11回日本蛋白質科学会年会(大阪府吹田市)

〔図書〕(計1件)

Halophilic Properties and their Manipulation and Application. in Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications, First Edition. Edited by Om V. Singh (Wiley-Blackwell) Arakawa T. Tokunaga H. Ishibashi M. Tokunaga M. 2013, pp. 95-121. DOI: 10.1002/9781118394144.ch4

〔その他〕

ホームページ等

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0029/information/2014/03/oubi-home.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA Masao)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20112782

(2)研究分担者

石橋 松二郎 (ISHIBASHI Matsujiro)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：20305163

徳永 廣子 (TOKUNAGA Hiroko)  
鹿児島大学・農学部・技能補佐員  
研究者番号：60381191